

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 03 May 2000 (03.05.00)	
International application No. PCT/JP99/05069	Applicant's or agent's file reference 1155
International filing date (day/month/year) 17 September 1999 (17.09.99)	Priority date (day/month/year) 18 September 1998 (18.09.98)
Applicant HOMMA, Yoshimi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

07 April 2000 (07.04.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 18 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Antonia Muller
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED
SEP 07 2001
TECH CENTER 1600/200111/09/99
09/28/2002
Translation
5640

Applicant's or agent's file reference 1155	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/05069	International filing date (day/month/year) 17 September 1999 (17.09.99)	Priority date (day/month/year) 18 September 1998 (18.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/09, C12Q 1/68		
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 07 April 2000 (07.04.00)	Date of completion of this report 06 December 2000 (06.12.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05069

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05069

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 1-8, 10-12

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-8, 10-12 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matters of claims 1-8 and 10-12 relate to a diagnostic method for the human body, which does not require an international preliminary examination by the International Preliminary Examining Authority in accordance with PCT Article 34(4)(a)(i) and Rule 67.1(iv).

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05069

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	9,13,14	YES
	Claims	15,16	NO
Inventive step (IS)	Claims	9,13,14	YES
	Claims	15,16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	9,13-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 15 and 16

Document 1: Human Molecular Genetics, 2 (7), 1993, Annett Behn-Krappa et al., "The state of DNA methylation in the promoter and exon 1 regions of the human gene for the interleukin-2 receptor α chain (IL-2R α) in various cell types," pages 993-999

describes a method of detecting the methylation degree of cytosine residues in the promoter and exon 1 region DNA of interleukin-2 receptor, using a methylation sensitive restriction enzyme. So, the subject matters of claims 15 and 16 do not appear to be novel.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05069

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁶ C12N15/09, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl.⁶ C12N15/09, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG)
BIOSIS/MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Human Molecular Genetics Vol. 2, No.7 (1993), Annett Behn-Krappa et al. "The state of DNA methylation in the promoter and exon 1 regions of the human gene for the interleukin-2 receptor α chain (IL-2R α) in various cell types", pages 993-999	15, 16 1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 December, 1999 (08.12.99)

Date of mailing of the international search report
21 December, 1999 (21.12.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 03 May 2000 (03.05.00)	
International application No. PCT/JP99/05069	Applicant's or agent's file reference 1155
International filing date (day/month/year) 17 September 1999 (17.09.99)	Priority date (day/month/year) 18 September 1998 (18.09.98)
Applicant HOMMA, Yoshimi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
07 April 2000 (07.04.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Antonia Muller

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



P.B. 5818 - Patentaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

European
Patent Office

Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

Harding, Charles Th.
D. Young & Co.
21 New Fetter Lane
London EC4A 1DA
GRANDE BRETAGNE

Datum/Date

07.11.02

Zeichen/Ref./Réf.

P011075EP CTH

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°

99943382.4-2405-JP9905069

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.





DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
X	WO 98 40487 A (ENDOWMENT RES INHUMAN BIOLOGY) 17 September 1998 (1998-09-17) * abstract; claims 42,43 * * page 3, line 15 - page 4, line 18 * * page 6, line 15 - line 26 * * page 28, line 1 - line 28 * * page 29, line 18 - line 29 * * page 38, line 7 - page 39, line 14 * * page 40, line 23 - line 31 * * page 42, paragraph 1 * ---	1-5,15, 16	C12N15/09 C12Q1/68
X	WO 97 44456 A (HARVARD COLLEGE) 27 November 1997 (1997-11-27) * abstract * * page 2, line 29 - line 30 * * page 38, line 7 - line 36 * * page 39, last paragraph * * page 51, line 25 - page 52, line 16 * ---	1-5,15, 16	
X	WO 98 00552 A (CHIANG MING KO ;FLANAGAN JOHN G (US); HARVARD COLLEGE (US)) 8 January 1998 (1998-01-08) * abstract; claim 62 * * page 40, line 9 - line 21 * ---	1-5,15, 16	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7) C12N
X	KANEKO Y ET AL: "HYPOMETHYLATION OF C-MYC AND EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR GENES IN HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND FETAL LIVER" JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH, vol. 76, no. 12, 1985, pages 1136-1140, XP001107188 ISSN: 0910-5050 * the whole document * --- -/--	1-3,5, 15,16	
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 22 October 2002	Examiner Pilat, D
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

1
EPO FORM 1503 03.02 (P4/C04)



DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (InLCI.7)
P, X	WO 99 07854 A (MIAO NINGNING ; ONTOGENY INC (US); PANG KEVIN (US); BARKER DOUGLAS) 18 February 1999 (1999-02-18) * abstract; claims 38, 39 * * page 1, line 28 - line 30 * * page 34, line 10 - page 35, line 24 * -----	1-5, 15, 16	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (InLCI.7)
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 22 October 2002	Examiner Pilat, D
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

1
EPO FORM 1503 03.82 (P04064)

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 99 94 3382

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

22-10-2002

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9840487	A	17-09-1998	AU	6560398 A	29-09-1998
			WO	9840487 A1	17-09-1998
WO 9744456	A	27-11-1997	US	5912141 A	15-06-1999
			WO	9744456 A2	27-11-1997
WO 9800552	A	08-01-1998	AU	3648297 A	21-01-1998
			WO	9800552 A2	08-01-1998
			US	6399326 B1	04-06-2002
WO 9907854	A	18-02-1999	AU	8778698 A	01-03-1999
			WO	9907854 A2	18-02-1999

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 99 94 3382

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

22-10-2002

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9840487	A	17-09-1998	AU	6560398 A	29-09-1998
			WO	9840487 A1	17-09-1998
WO 9744456	A	27-11-1997	US	5912141 A	15-06-1999
			WO	9744456 A2	27-11-1997
WO 9800552	A	08-01-1998	AU	3648297 A	21-01-1998
			WO	9800552 A2	08-01-1998
			US	6399326 B1	04-06-2002
WO 9907854	A	18-02-1999	AU	8778698 A	01-03-1999
			WO	9907854 A2	18-02-1999

EP



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 1155	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP99/05069	国際出願日 (日.月.年) 17.09.99	優先日 (日.月.年) 18.09.98	
出願人(氏名又は名称) 協和醗酵工業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/09, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/09, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)

BIOSIS/MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	Human Molecular Genetics Vol.2 No.7 (1993) Annett Behn-Krappa et al. "The state of DNA methylation in the promoter and exon 1 regions of the human gene for the interleukin-2 receptor α chain (IL-2R α) in various cell types" p. 993-999	<u>15, 16</u> 1-14

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 12. 99

国際調査報告の発送日

21.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

9548

(57)要約

本発明は、サイトカイン受容体遺伝子の発現に関与する領域における、シトシン残基のメチル化の程度を分析することを特徴とする細胞増殖性疾患の診断法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BG ブルガリア
BH バ레인
BR ブラジル
BS バルムス
CA カナダ
CC 中央アフリカ
CG コンゴ
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CR コスタ・リカ
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェコ
DE ドイツ
DK デンマーク

DM ドミニカ
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE ジョージア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサウ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国

KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MA モロッコ
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NZ ニュージーランド
NO ノールウェー
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア

RU ロシア
RW ルワンダ
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロベニア
SK スロヴァキア
SL シェラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャド
TG トーゴ
TH タイ
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴェトナム
YU ユーゴスラビア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明 細 書

細胞増殖性疾患の診断法

技術分野

本発明は、サイトカイン受容体遺伝子の発現に関与する領域における、シトシン残基のメチル化の程度を分析することを特徴とする、細胞増殖性疾患の診断法に関する。

背景技術

真核生物のDNAはそのシトシン残基の5位の位置にメチル化を受けている場合がある[Cell, 70, 5-8 (1992)、Blood, 93, 4059-4070 (1999)]。哺乳類では細胞の分化や癌化に伴って、染色体DNA(ゲノムDNA)のメチル化の状態が変化することが知られている。メチル化反応はDNA(シトシン-5)メチルトランスフェラーゼ(EC 2.1.1.37)という酵素によって触媒される[BioEssays, 17, 139-145 (1995)]。本酵素は、CpGのジヌクレオチド配列またはCpNpG[NはA(アデニン)、C(シトシン)、G(グアニン)、T(チミン)のいずれでもよい]のトリヌクレオチド配列のシトシン残基をメチル化する。また、本酵素は、DNA二重鎖のうち片側鎖だけがメチル化された状態を特異的に認識し、相補鎖のシトシン残基をメチル化する。また、最近になってDNAの脱メチル化を触媒する酵素の存在を示唆する報告があった[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 5894-5896 (1999)]。DNAのメチル化状態が生殖(減数分裂)を通じて、インプリンティングと呼ばれる遺伝様式で子孫に伝えられる場合があることが知られている[Trends in Genet. (TIG), 13, 323-329 (1997)]。

一部の遺伝子の非コード領域にはCpG配列が豊富に存在するCpGアイランドと呼ばれる部分があり、CpGアイランドの中のシトシン残基のメチル化状態はその遺伝子の転写発現に影響を及ぼす。すなわち、メチル化が少ないほどその遺伝子の転写が亢進し、メチル化が多いほど転写が抑制される[Trends in Genet., 13, 444-449 (1997)]。遺伝子発現に影響を及ぼすCpGアイランドは遺伝子のプロモーター領域にあることが多いが、イントロン中に存在する場合もあることが報告されている[Nature, 389, 745-749 (1997)]。CpGアイランドのDNAがメチル化されていると遺伝子発現が低下する機構に

については次のことが知られている。メチル化されたCpGアイランドにはMeCP2(methyl CpG binding repressor 2)と呼ばれるタンパク質が結合し、これがヒストンの脱アセチル化酵素を活性化する。その結果、周辺のクロマチン構造が縮合型に変化し、RNAポリメラーゼや転写因子がプロモーター領域に入っていけなくなるため、転写発現が低下する[J. Biochem., 125, 217-222 (1999)]。

細胞増殖性疾患の中では、癌の発症にDNAメチル化が関わるということが知られている[Adv. Cancer Res., 72, 141-196 (1998)]。しかし、そのほとんどは癌抑制遺伝子のCpGアイランドがメチル化を受けて発現が低下する結果、細胞が癌化するという報告であり、サイトカイン受容体遺伝子のメチル化が関与するという例は知られていない。また、癌以外の細胞増殖性疾患において、ゲノムDNAのメチル化パターンが変化しているということは知られていない。

ゲノムDNAのメチル化の状態を調べる方法としては、メチル化感受性制限酵素を用いる方法、ヒドラジンや過マンガン酸や重亜硫酸ナトリウムによる化学修飾を用いる方法、メチル化DNAに特異的な抗体を用いた免疫学的方法[Nucleic Acids Res., 26, 2255-2264 (1998)]、MeCP2などのMBD(methyl-CpG binding domain)を用いたアフィニティ・カラム法およびDGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 2913-2918 (1999)]などがあるが、広く用いられているのは重亜硫酸ナトリウム処理を用いる方法である[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1827-1831 (1992), Nucl. Acids Res., 22, 2990-2997 (1994)]。

この方法は次のような原理に基づく。

DNAをアルカリ処理して一本鎖にした後に重亜硫酸ナトリウムで処理すると、シトシン残基は脱アミノ化をうけウラシル残基になるが、メチル化されたシトシン残基はそのまま残る。そのような処理をしたDNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase Chain Reaction; 以下、PCRと記す)を行なう。このとき、増幅したい部分の塩基配列のシトシンをチミンに置換した塩基配列に対応するプライマーを設計する。このようなプライマーを用いて増幅すると、もとのゲノムDNAにおいてメチル化されているシトシン残基の部分はシトシンとして増幅されるのに対し、メチル化されていないシトシン残基の部分はチミン残基として増幅される。従って、これらのPCR産物の塩基配列を決定すれば、もとのゲノムDNA上でのメチル化の有無を知ることができる。

乾癬(ソリアシスpsoriasis)は慢性の炎症性皮膚疾患であり、表皮細胞の異常増殖を伴う細胞増殖性疾患である。白人では人口の2%以上が罹病する[The Lancet, 350, 349-353 (1997)、The Lancet, 338, 227-230(1991)、The Lancet, 338, 231-234(1991)]。多くの場合、成人になってから発症する。乾癬の病因に関してはまだわかっていない。乾癬が多発する家系も知られており、遺伝因子の関与を示唆する報告もあるが、原因遺伝子そのものは知られていない[Nature Genetics, 14, 231-233(1996)、Science, 264, 1141-1145(1994)、Arch. Dermatol., 130, 216-224 (1994)]。一方、患部のケラチノサイトでは表皮増殖因子受容体(epidermal growth factor receptor、EGF-R)の発現が亢進しているとの報告がある[J. Dermatol. Sci., 16, 120-128 (1998)]。通常、ケラチノサイトでのEGF-Rの発現は、インターロイキン-6(IL-6)による刺激によって誘導されるが、乾癬のケラチノサイトではIL-6の刺激の有無にかかわらずEGF-Rが発現していた。

EGF-R遺伝子のプロモーター領域はCpG配列が豊富であり、またその領域には転写調節因子が結合することが示されている[J. Biol. Chem., 266, 1746-1753 (1991)、J. Biol. Chem., 263, 5693-5699 (1988)]。

ヒトの表皮増殖因子受容体(EGF-R)遺伝子のプロモーター領域の配列は、GenBankデータベースのアクセション番号M38425に開示されている。塩基配列中で、翻訳開始点(1114番目)の上流約500塩基の領域および第1イントロンの開始点の下流約800塩基の領域が特にCpG配列が豊富であり、転写調節因子の結合配列が点在している[J. Biol. Chem., 266, 1746-1753 (1991)、J. Biol. Chem., 263, 5693-5699 (1988)]。

従来、乾癬の診断は、Dermatologica, 157, 238-244 (1978)、J. Dermatol. Sci., 16, 165-169 (1998)などに記載の診断基準(PASI; psoriasis area and severity index)に従って、もっぱら皮膚科医の長期間に渡る観察により行なわれている。このような方法は熟練した皮膚科医を必要とし、組織病変や症状の経過観察に多くの時間と労力を要する。このため、迅速かつ確実に再現性の高い診断方法が求められている。

慢性関節リウマチは全身性の自己免疫疾患のひとつであり、関節滑膜細胞の異常増殖と炎症とを伴う細胞増殖性疾患である。[Nippon Rinsho, 57, 333-338 (1999)]慢性関節リウマチの病因に関してはまだよくわかっていない。慢性関節リウマチが多発する家系も知られており、ヒトの組織適合性抗原HLA-DR4の遺伝子型との相関が示唆され

ているが、原因遺伝子そのものは知られていない。患部においては表皮増殖因子様受容体2(erbB2/HER2/neu)の活性が亢進しているとの報告がある[Seminars in Arthritis & Rheumatism, 21, 317-329 (1992)]。

ヒトの表皮増殖因子様受容体2(erbB2/HER2/neu)遺伝子のプロモーター領域の配列は、GenBankデータベースのアクセシオン番号Z13970に開示されている。この領域はCpG配列が豊富であり、転写調節因子Sp1が結合することが示唆されている[Mol. Cell. Biol., 7, 2597-2601 (1987)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4374-4378 (1987)、J. Biol. Chem., 265, 4389-4393 (1990)、Gene 136, 361-364 (1993)、Cancer Res., 54, 4193-4199 (1994)]。

従来、慢性関節リウマチの診断は、[Arthritis Reum., 31, 315-324 (1988)]などに記載の診断基準に従って、もっぱら専門医の長期間に渡る観察によって行なわれている。このような方法は熟練した医師を必要とし、組織病変や症状の経過観察に多くの時間と労力を要する。このため、迅速かつ確実に再現性の高い診断方法が求められている。

発明の開示

本発明は、迅速かつ確実に再現性の高い細胞増殖性疾患の診断方法を提供することにある。

本発明は、以下の(1)～(16)に関する。

- (1) サイトカイン受容体遺伝子の発現に関与する染色体DNAにおける、特定領域のシトシン残基のメチル化の程度を測定することを特徴とする、細胞増殖性疾患の診断法。
- (2) サイトカイン受容体遺伝子が、チロシンキナーゼ型受容体ファミリー、セリンートレオニンキナーゼ型受容体ファミリー、インターロイキン受容体ファミリー、インターフェロン受容体ファミリー、免疫グロブリン受容体ファミリー、細胞死受容体ファミリー、7回膜貫通型受容体ファミリーから選ばれる受容体の遺伝子である、上記(1)記載の診断法。
- (3) チロシンキナーゼ型受容体遺伝子が、表皮増殖因子受容体、表皮増殖因子様受容体2(erbB2/HER2/neu)、血小板由来増殖因子受容体および血管内皮細胞増殖

因子受容体から選ばれる受容体の遺伝子である、上記(2)記載の診断法。

(4) 細胞増殖性疾患が、乾癬、慢性関節リウマチ、動脈硬化、再狭窄、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および固形腫瘍から選ばれる細胞増殖性疾患である、上記(1)記載の診断法。

(5) 特定領域がプロモーターまたはイントロンのCpGアイランド中にある領域である上記(1)記載の診断法。

(6) 特定領域が表皮増殖因子受容体遺伝子の発現に関与する領域であって、配列番号4記載の塩基配列中の、塩基番号381～962の塩基配列で示される領域である、上記(1)記載の診断法。

(7) 配列番号4における塩基番号668、671、687および697のシトシン残基のメチル化の程度を測定することを特徴とする、上記(6)記載の診断法。

(8) 配列番号4における、塩基番号668のシトシン残基のメチル化の程度を調べることとを特徴とする、上記(7)記載の診断法。

(9) 上記(1)～(8)記載の診断法のいずれかに用いる、配列番号1および2記載の塩基配列を有するDNAプライマー。

(10) 特定領域が、表皮増殖因子様受容体2(erbB2/HER2/neu)遺伝子の発現に関与する領域であって、配列番号8記載の塩基配列で示される領域である、上記(1)記載の診断法。

(11) 配列番号8における塩基番号268、276および288のシトシン残基のメチル化の程度を測定することを特徴とする、上記(10)記載の診断法。

(12) 配列番号8における、塩基番号268のシトシン残基のメチル化の程度を調べることとを特徴とする、上記(11)記載の診断法。

(13) 上記(1)～(4)および(10)～(12)記載の診断法のいずれかに用いる、配列番号5または6記載の塩基配列を有するDNAプライマー。

(14) 配列番号1、2、5または6で示される塩基配列を有するDNA。

(15) サイトカイン受容体遺伝子の発現に関与するDNAにおいて特定領域のシトシン残基のメチル化の程度を検出する方法。

(16) メチル化の程度を検出する方法が、メチル化感受性制限酵素を用いる方法、ヒドラジン、過マンガン酸または重亜硫酸ナトリウムによる化学修飾を用いる方法、もしくは

メチル化DNAに特異的な抗体を用いる免疫学的方法、アフィニティカラム法もしくはDGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)法である上記(15)記載の方法。

本発明はサイトカイン受容体遺伝子の発現に関与する染色体DNAにおける、特定領域のシトシン残基のメチル化の程度を測定することを特徴とする、細胞増殖性疾患の診断法に関する。

サイトカインとは、動物細胞の増殖および分化を制御する、タンパク質性の細胞間シグナル伝達分子の総称である。

サイトカイン受容体としては、チロシンキナーゼ型受容体ファミリー、セリントレオニンキナーゼ型受容体ファミリー、インターロイキン受容体ファミリー、インターフェロン受容体ファミリー、免疫グロブリン受容体ファミリー、細胞死受容体ファミリー、7回膜貫通型受容体ファミリーなどがあげられる。

チロシンキナーゼ型受容体ファミリーとしては、表皮増殖因子受容体(Epidermal Growth Factor-Receptor;以下EGF-Rと称す)[J. Biol. Chem., 266, 1746-1753 (1991)、J. Biol. Chem., 263, 5693-5699 (1988)]、表皮細胞増殖因子(EGF-R)様受容体2(erbB2/HER2/neu)[Biochim. Biophys. Acta, 1377, M25-M37 (1998)、Biochim. Biophys. Acta, 1198, 165-184 (1994)、Molec. Cell. Biol., 7, 2597-2601 (1987)]、血小板由来増殖因子受容体(Platelet Derived Growth Factor Receptor; 以下PDGF-Rと称す)[J. Biol. Chem., 269, 32023-32026 (1994)、Oncogene, 10, 1667-1672 (1995)]、血管内皮細胞増殖因子受容体(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor;以下VEGF-Rと称す)[J. Biol. Chem., 270, 27948-27953 (1995)]などがあげられる。

上述した受容体遺伝子の発現に関与する領域としては、EGF-R遺伝子の翻訳開始点上流-152から-733番目の塩基までの領域、erbB2/HER2/neu遺伝子の翻訳開始点上流-1から-647番目の塩基までの領域[Mol. Cell. Biol., 7, 2597-2601 (1987)]、PDGF-R遺伝子の転写開始点上流-1から-2060番目の塩基までの領域[Oncogene, 10, 1667-1672 (1995)]、VEGF-R遺伝子の転写開始点の周辺-720から+548番目の塩基までの領域[J. Biol. Chem., 270, 27948-27953 (1995)]などがあげられる。

細胞増殖性疾患とは、例えば乾癬などのような表皮細胞の増殖および角化異常を伴った角質肥厚を特徴とする疾患を意味しており、滑膜細胞の増殖および絨毛肥厚を特

徴とする慢性関節リウマチ、動脈平滑筋細胞の増殖および血管中膜肥厚を特徴とする動脈硬化や再狭窄 (restenosis)、血管内皮細胞の増殖および血管新生を特徴とする糖尿病性網膜症や未熟児網膜症や固形腫瘍などがあげられる。

以下に、乾癬を例にとり、その診断法について記す。

被験者からの、血液、唾液、精液、皮膚組織、生検した組織片などを試料とし、各試料から染色体DNA(ゲノムDNA)を採取する。

各試料からゲノムDNAを採取する方法としては、[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1245-1249 (1977)] に記載の方法や、レディアンブ™ ジェノミックDNA ピュリフィケーションシステム(ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System、Promega社製)を用いる方法などがあげられる。

上記で得られたゲノムDNAのメチル化の程度を確認する方法としては、[Nucleic Acids Res., 26, 2255-2264(1998)]に記載された、メチル化感受性制限酵素を用いる方法、ヒドラジンや過マンガン酸や重亜硫酸ナトリウムによる化学修飾を用いる方法、メチル化DNAに特異的な抗体を用いた免疫学的方法、MeCP2などのMBD(methyl-CpG binding domain)を用いたアフィニティ・カラム法およびDGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 2913-2018 (1999)]などがあげられる。具体的には、以下の方法をあげることができる。

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1827-1831 (1992)に記載された方法に準じて、重亜硫酸ナトリウム処理を行う。該処理により、シトシン残基は脱アミノ化してウラシル残基になるが、メチル化シトシン残基はそのまま残る。

EGF-R遺伝子の発現に関与する領域をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法により増幅するために、プライマーを設計する。該プライマーは、増幅する配列部分のうち、シトシンをウラシルと読み替えた配列を想定して設計する。増幅する配列部分としては、CpG配列を多く含む配列部分が望ましい。表皮増殖因子受容体(EGF-R)遺伝子においては、プロモーター配列部分があげられる。具体的には、配列番号4記載の配列のうち、塩基番号381から962までの配列である。配列番号4の塩基番号1114にEGF-Rの翻訳開始点があり、その上流-152番目の塩基から-733番目の塩基までがプロモーター領域に相当する。プライマーとしては、増幅する配列部分をもとに設計したものであれば、いかなるものでもよい。具体的には、配列番号1および配列番号2記載の塩基配列が

あげられる。

上記のプライマーを用いてPCRを行うことにより、メチル化シトシン残基はシトシンとして増幅され、非メチル化シトシン残基はチミン残基として増幅される。すなわち、該PCRで増幅されたDNA(以下PCR産物と略記する)の塩基配列を解読することにより、もとのゲノムにおいてそのシトシン残基がどの程度メチル化されていたかを確認することができる。

該PCR産物の塩基配列は以下のようにして解読する。

まず、J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis Molecular Cloning a Laboratory Manual 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)(以下、モレキュラー・クローニング 第2版と略記する)に記載されているアガロースゲル電気泳動などの方法により、該PCR産物を分画・抽出・精製する。

次に、精製した該PCR産物を鋳型DNAとし、配列番号2記載のプライマー、DNAポリメラーゼおよびジデオキシヌクレオチドを用いた塩基配列決定反応を行なう。塩基配列決定反応は、ジデオキシヌクレオチド存在下で、DNAポリメラーゼを用いてヌクレオチドを重合させることにより行なう。具体的には、モレキュラー・クローニング 第2版に記載されている放射性同位元素で標識したヌクレオチドを重合させる方法、あるいはPerkin Elmer社のダイ・ターミネーター・サイクル・シーケンシング・キット(Dye Terminator Cycle Sequencing Kit)とPerkinElmer社のサーマル・サイクラー(Thermal CyclerTM)などのキットを用いて蛍光色素標識したヌクレオチドを重合させる方法、などをあげることができる。

配列決定反応を行なった試料の塩基配列を解読する方法としては、放射性同位元素で標識したヌクレオチドを取込んだ反応試料を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動したのちオートラジオグラフィを行なって解読する方法(モレキュラー・クローニング 第2版)、あるいは蛍光試薬標識したヌクレオチドを取込んだ反応試料をPRISMTM 310 Genetic Analyzer(PE Applied Biotechnologies社)などの自動塩基配列解読装置を用いて解読する方法、などをあげることができる。

上述の処理を行なってPCR産物の塩基配列を解読すると、ゲノムDNAにおいてシトシン残基がメチル化されているところでは、オートラジオグラフィまたは自動塩基配列解読装置におけるシグナルがシトシンのみのピークとなり、メチル化されていないところ

では、そのシグナルがチミンのみのピークとなる。しかし、部分的にメチル化されているところでは、シトシンとチミンとが混在したシグナルとなる。

さらに、メチル化の程度を調べるために、該PCR産物を適当なベクターにクローニングし、いくつかのクローンの塩基配列を解読する。

クローニングベクターとしては、pUC19やpBlueScript SK(−)(Stratagene社)などのプラスミド・ベクター、もしくはM13mp19やλgt11などのファージ・ベクターなどがあげられる。

クローニングはモレキュラー・クローニング 第2版などに記載されている方法に準じて行なうことができる。すなわち、ベクターにPCR産物を挿入・連結し、JM109株やDH5α株などの宿主大腸菌にトランスフォームして、コロニーを選抜する。それぞれのコロニーの大腸菌を培養し、それぞれのクローン化DNAを抽出・精製する。

これらのクローン化DNAの塩基配列を上述した方法に基づいて解読する。すなわち、それぞれのクローン化DNAを鋳型として上述した配列決定反応を行ない、反応試料をオートラジオグラフィーや自動塩基配列解読装置を用いて塩基配列を解読する。

塩基配列解読後、シトシン残基のメチル化パターンについて解析を行う。具体的には、EGF-R遺伝子の翻訳開始点(配列番号4記載の塩基番号1114に相当)から−446、−443、−427および−417番目(配列番号4記載の塩基番号668、671、687および697に相当)のシトシン残基を解析する。実施例1(10)の第1表に示した30人の患者と30人の健常者を用いた診断の結果からわかるように、これら4残基のうちメチル化された残基数の合計が2以下である場合、83%程度(25/30)の確率をもって乾癬であると診断できる。その際、健常者を患者と誤診してしまう確率は13%程度(4/30)となる。もしくは、実施例1(11)に示したように−446番目のシトシン残基がメチル化されていない場合、83%程度(25/30)の確率をもって乾癬であると診断できる。この際、健常者を患者と誤診してしまう確率は33%程度(10/30)である。

以上は、乾癬の診断方法について記載したが、慢性関節リウマチにおいても同様にして診断を行うことができる。実施例2(9)の第2表に示した9人の患者と3人の健常者を用いた診断の結果から分かるように、erbB2遺伝子の翻訳開始点上流−380、−372および−360番目(配列番号8における塩基番号268、276および288に相当)のシトシン残基のうちメチル化された残基数の合計が1以下である場合、慢性関節リウマチで

あると診断できる。その際、健常者を患者と誤診してしまう確率は33%程度(1/3)となる。また、実施例2(10)に示したように-380番目(配列番号8における塩基番号268に相当)のシトシン残基がメチル化されていない場合、67%程度(6/9)の確率をもって慢性関節リウマチであると診断できる。

図面の簡単な説明

第1図は、EGF-RのゲノムDNAの翻訳開始点(配列番号4の塩基番号1114)から-446、-443、-427および-417番目(配列番号4の塩基番号668、671、687および697に相当)のシトシン残基のメチル化状態を示す。N1からN30までは健常者の被験者30名を、P1からP30までは乾癬患者の被験者30名を、それぞれ表わす。配列を解析した20クローンのうち最も高頻度で出現したメチル化パターンを代表として示した。シトシン残基がメチル化されていた場合には黒丸(●)が記してある。

第2図は、実施例2(7)の結果から得られた、各被験者のゲノムDNAのerbB2遺伝子のプロモーター領域のシトシンのメチル化パターンのうち、翻訳開始点上流-380、-372および-360番目(配列番号8における塩基番号268、276および288に相当)のシトシン残基のメチル化状態を示す。C1からC3までは健常者の被験者3名を、R1からR9までは慢性関節リウマチ患者の被験者9名を、それぞれ表わす。配列を解析した20クローンのうち最も高頻度で出現したメチル化パターンを代表として示した。シトシン残基がメチル化されていた場合には黒丸(●)が記してある。

発明を実施するための最良の形態

実施例1

(1)被験者の選定

被験者における乾癬の罹病の有無とその程度については、国際的な診断基準(PASI) [Dermatologica, 157, 238-244 (1978)、J. Dermatol. Sci., 16, 165-169 (1998)]に基づき、専門医が診断した。乾癬と診断された患者30名と健常者30名とを選抜し、被験者とした。

(2)被験者から染色体(ゲノム)DNAの採取

各被験者から上腕静脈血0.4mlを採取した。採取した血液よりDNAを抽出、精製した。

該DNAの抽出および精製は、ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System (Promega社製)を用い、添付のマニュアルに従って行った。精製されたDNAは、TE緩衝液(10mMトリス塩酸塩、1mM EDTA、pH8.0)に溶解し、終濃度100 μ g/mlとした。これをゲノムDNA検体として用いた。

(3)ゲノムDNA検体の重亜硫酸ナトリウム処理

実施例1(2)で得たそれぞれのゲノムDNA検体に対し、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1827-1831 (1992)に記載の方法に準じ、重亜硫酸ナトリウム処理を行なった。

ゲノムDNA検体1 μ gに、キャリアーDNAとしてpBluescript SK(-)プラスミドDNA (Stratagene社製)を9 μ g加えた試料を、0.25M水酸化ナトリウム水溶液50 μ l中、37℃で10分間インキュベートすることにより変性させた。これに3.6M重亜硫酸ナトリウム水溶液(pH5.0)520 μ lと10mMヒドロキノン水溶液30 μ lを加え、50℃で16時間インキュベートした。

Wizard Genomic DNA Purification System (Promega社製)を用い、添付マニュアルに従ってDNAを精製し、TE緩衝液(10mMトリス塩酸塩、1mM EDTA、pH8.0)50 μ lで精製DNAを溶出した。溶出したDNAに2N水酸化ナトリウム5 μ lを加えて混合し、室温で5分間インキュベートし、100%エタノール100 μ lを加えて攪拌したのち、-20℃で30分間放置した。放置後、10,000 \times gで10分間遠心分離して得られた沈澱物に70%エタノール100 μ lを加えて懸濁させた。懸濁後、10,000 \times gで5分間遠心分離して沈澱物を得た。沈澱物を真空下で乾燥させた後、50 μ lの純水に溶解し、重亜硫酸ナトリウム処理DNA検体とした。

(4)PCRプライマーの設計と合成

ヒトの表皮増殖因子受容体(EGF-R)遺伝子のプロモーター周辺領域に豊富に存在するCpG配列のシトシン残基のメチル化を解析した。EGF-R遺伝子のプロモーター周辺領域とは、EGF-R遺伝子の翻訳開始点上流-152~-733番目の塩基配列を示し、これは、配列番号4の塩基配列中の381~962の塩基配列で示される領域である。該領域のシトシン残基のメチル化を解析するためのPCRプライマーである、MP3(配列番号1)およびMP4(配列番号2)の配列の設計については以下のようにして行なった。

実施例1(3)の重亜硫酸ナトリウム処理により非メチル化シトシン残基はウラシル残基となる。したがって、PCR増幅後、塩基配列はチミン残基となる。そこで、まず本領域の

シトシン残基(C)をチミン残基(T)に替えた配列を想定し、配列番号3に示した。

MP4プライマー(配列番号2)は、配列番号3の塩基番号1から32に対応するセンスプライマーであるが、後のクローニング工程を容易にするため、5'末端付近(配列番号2記載の塩基番号7から12)に制限酵素HindIIIの切断配列(AAGCTT)を導入した。

また、MP3プライマー(配列番号1)は、配列番号3の塩基番号553から582に対応するアンチセンスプライマーであるが、後のクローニング工程を容易にするため、5'末端付近(配列番号1記載の塩基番号8から13)に制限酵素EcoRIの切断配列(GAATTC)を導入した。

上述のプライマーは、オリゴヌクレオチドを化学合成することにより取得した。

(5)PCRによる増幅

実施例1(3)で得られたそれぞれの重亜硫酸ナトリウム処理DNA検体(患者由来30種類、健常者由来30種類)を鋳型DNAとし、MP3プライマーおよびMP4プライマーを用いて以下のようなPCRをそれぞれ行なった。

それぞれの鋳型DNA1 μ lに対し、純水35.5 μ l、塩化マグネシウム入り10 \times PCR緩衝液(GIBCO BRL社製)5 μ l、10mM dNTPミックス(GIBCO BRL社製)1 μ l、ジメチルスルホキシド(DMSO; Sigma社製)2.5 μ l、をそれぞれ加えた。さらに、MP3プライマーおよびMP4プライマーをそれぞれ20 μ Mとなるように純水に溶かしたものを、それぞれ2.5 μ lずつ加え、混合した。該混合物(50 μ l)を95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した後、1単位のTaq DNAポリメラーゼ(GIBCO BRL社製)を加えた。PerkinElmer社のサーマル・サイクラー(Thermal Cycler TM)を用いて、[96 $^{\circ}$ Cで45秒間、53 $^{\circ}$ Cで30秒間、72 $^{\circ}$ Cで1分間]のプログラムで35サイクルのPCRを行なった。

(6)PCR産物の精製

実施例1(5)で得たそれぞれのPCR産物をモレキュラー・クローニング 第2版に記載されている方法に従って、低融点アガロースゲル電気泳動で分画した。該低融点アガロースゲルを臭化エチジウムで染色した後、紫外線照射下で582bp(塩基対)のバンド部分の低融点アガロースゲルを切出し、Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega社製)を用い、添付マニュアルに従ってDNAを精製し、TE緩衝液(10mMトリス塩酸塩、1mM EDTA、pH8.0)50 μ lで精製DNAを溶出し、精製PCR産物とした。

(7)PCR産物の直接塩基配列決定

実施例1(6)の方法により取得された精製PCR産物の塩基配列を解析した。

まず、Perkin Elmer社のダイ・ターミネーター・サイクル・シーケンシング・キット(Dye Terminator Cycle Sequencing Kit)とPerkin Elmer社のサーマル・サイクラー(Thermal Cycler™)とを用いて、精製PCR産物を鋳型として、MP4プライマーを用い、蛍光標識したヌクレオチドを取込ませる配列決定反応を行なった。反応操作はキットに添付されたマニュアルに従って行なった。

次に、それぞれの反応試料について、自動塩基配列解読装置PRISM™ 310 Genetic Analyzer(PE Applied Biotechnologies社)を用いて、装置に添付されたマニュアルに従って塩基配列を解読した。

この解読結果から、各被験者から採取したゲノムDNA検体におけるシトシン残基のメチル化の程度を特定することができた。すなわちメチル化されているところでは、自動塩基配列解読装置におけるシグナルがシトシンのみのピークとなり、メチル化されていないところでは、そのシグナルがチミンのみのピークとなる。しかし、部分的にメチル化されているところでは、シトシンとチミンとが混在したようなシグナルとなる。

さらに、メチル化の程度を調べるために、該PCR産物をベクターにクローニングし、いくつかのクローンの塩基配列を解読した。

(8)PCR産物のクローニングと塩基配列決定

実施例1(6)で得た精製PCR産物10 μ lに、1 μ lのリアクトバッファー2(GIBCO BRL社製)、1単位の制限酵素EcoRI(GIBCO BRL社製)および1単位のHindIII(GIBCO BRL社製)とを加え、37℃で1時間反応させて、精製PCR産物であるDNAを切断した。該DNAを100%エタノール100 μ lを加え攪拌し-20℃で30分間放置後、10,000 \times gで10分間遠心分離して沈殿物を得た。該沈殿物を70%エタノール100 μ lを加え懸濁した後、10,000 \times gで5分間遠心分離して沈殿物を得た。該沈殿物を真空下に乾燥させ、20 μ lの純水に溶解し、EcoRI-HindIII切断DNA断片とした。

一方、同様にして0.5 μ gのpBluescript SK(-)プラスミドDNA(Stratagene社製)を制限酵素EcoRIとHindIIIとで切断し、モレキュラー・クローニング 第2版に記載の低融点アガロースゲル電気泳動により約2.7kbpのDNA断片を分画し、Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega社製)を用い、添付マニュアルに従ってDNAを精製し、TE緩衝液(10mMトリス塩酸塩、1mM EDTA、pH8.0) 50 μ lで精製DNAを溶出し

EcoRI－HindIII切断ベクターDNA断片とした。

上述で得られたEcoRI－HindIII切断DNA断片1 μ lとEcoRI－HindIII切断ベクターDNA断片0.5 μ lとを混合し、これに純水6 μ l、T4DNAリガーゼ用バッファー (GIBCO BRL社製) 2 μ l、T4DNAリガーゼ (GIBCO BRL社製) 1単位を加えたのち、16℃で16時間のDNA連結反応を行なった。

それぞれのDNA連結反応産物を、モレキュラー・クローニング 第2版に記載の方法に従って大腸菌JM109株にトランスフォームした。トランスフォームした大腸菌JM109株を、50 μ g/mlのアンプシリン (Sigma社製)、40 μ g/mlのイソプロピルチオ- β -D-ガラクトシド (Sigma社製) および40 μ g/mlのX-gal (Sigma社製)を含む LB平板寒天培地 (モレキュラー・クローニング 第2版) 上で37℃で1日間培養した。平板寒天培地上に生じた白色のコロニーを、それぞれ20個ずつ任意に選び、それぞれからプラスミドDNAをモレキュラー・クローニング 第2版に従って調製した。

それぞれのプラスミドDNAを鋳型とし、プライマーにはユニバーサル・プライマーを用い、Perkin Elmer社のダイ・ターミネーター・サイクル・シーケンシング・キット (Dye Terminator Cycle Sequencing Kit) とPerkinElmer社のサーマル・サイクラー (Thermal Cycler TM) とを用いて、蛍光標識したヌクレオチドを取込ませる配列決定反応を行なった。反応操作はキットに添付されたマニュアルに従って行なった。それぞれの反応試料について、自動塩基配列解読装置PRISMTM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biotechnologies社)を用いて、装置に添付されたマニュアルに従って塩基配列を解読した。

この解読結果から、各被験者から採取したゲノムDNA検体におけるシトシン残基のメチル化のパターンを特定することができた。

(9)シトシン残基のメチル化状態

実施例1(7)および(8)の結果とから、各被験者のゲノムDNAのEGF-R遺伝子のプロモーター領域のシトシンのメチル化パターンについて、翻訳開始点から-446、-443、-427および-417番目 (配列番号4中の塩基番号668、671、687および697塩基) のシトシン残基のメチル化を第1図に示した。N1からN30までは健常者の被験者30名を、P1からP30までは乾癬患者の被験者30名を、それぞれ表わす。配列を解析した20クローンのうち最も高頻度で出現したメチル化パターンを代表として示した。シトシン残基がメ

チル化されていた場合には黒丸(●)が記してある。メチル化されていなかった場合には空白としてある。

(10) 乾癬の診断法 1

EGF-R遺伝子の転写開始点から-446、-443、-427および-417番目の4個のシトシン残基のうち、メチル化されたシトシン残基を数えた。例えば、N1は4、N2は3、P1は1、P2は0、という具合である。この数を健常者と患者とでのそれぞれの度数分布を見た結果を下記表に示す。

第 1 表

メチル化残基の数	0	1	2	3	4
健常者	1	0	3	16	10
患者	15	7	3	5	0

メチル化された残基数が1以下という診断基準を設定した場合、73%程度(22/30)の確率をもって乾癬であると診断できる。その際、健常者を患者と誤診してしまう確率は3%程度(1/30)である。

同残基数が2以下という診断基準を設定した場合、83%程度(25/30)の確率をもって乾癬であると診断できる。その際、健常者を患者と誤診してしまう確率は13%程度(4/30)である。

(11) 乾癬の診断法 (その2)

-446番目のシトシン残基に注目する。この残基がメチル化されている者は患者では5名、健常者では20名である。よって、このシトシン残基がメチル化されていない場合、83%程度(25/30)の確率をもって乾癬であると診断できる。その際、健常者を患者と誤診してしまう確率は33%程度(10/30)である。

実施例2

(1) 被験者の選定

被験者における慢性関節リウマチの罹病の有無とその程度については、アメリカリウ

マチ学会の診断基準[Arthritis Reum., 31, 315-324 (1988)]に基づき、専門医が診断した。慢性関節リウマチと診断された患者9名と健常者3名とを選抜し、被験者とした。

(2)被験者からゲノムDNAの採取

実施例2(1)の各被験者から上腕静脈血0.4mlを採取した。採取した血液よりDNAを抽出、精製した。該DNAの抽出および精製は、ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System (Promega社製)を用い、添付のマニュアルに従って行った。精製されたDNAは、TE緩衝液(10mMトリス塩酸塩、1mM EDTA、pH8.0)に溶解し、終濃度100 μ g/mlとした。これをゲノムDNA検体として用いた。

(3)ゲノムDNA検体の重亜硫酸ナトリウム処理

実施例2(2)で得たそれぞれのゲノムDNA検体に対し、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1827-1831 (1992)に記載の方法に準じ、重亜硫酸ナトリウム処理を行なった。

ゲノムDNA検体1 μ gに、キャリアーDNAとしてpBluescript SK(-)プラスミドDNA (Stratagene社製)を9 μ g加えた試料を、0.25M水酸化ナトリウム水溶液50 μ l中、37℃で10分間インキュベートすることにより変性させた。これに3.6M重亜硫酸ナトリウム水溶液(pH5.0)520 μ lと10mMヒドロキノン水溶液30 μ lを加え、50℃で16時間インキュベートした。

Wizard Genomic DNA Purification System (Promega社製)を用い、添付マニュアルに従ってDNAを精製し、TE緩衝液(10mMトリス塩酸塩、1mM EDTA、pH8.0)50 μ lで精製DNAを溶出した。溶出したDNAに2N水酸化ナトリウム5 μ lを加えて混合し、室温で5分間インキュベートし、100%エタノール100 μ lを加えて攪拌したのち、-20℃で30分間放置した。放置後、10,000 \times gで10分間遠心分離して得られた沈澱物に70%エタノール100 μ lを加えて懸濁させた。懸濁後、10,000 \times gで5分間遠心分離して沈澱物を得た。沈澱物を真空下で乾燥させた後、50 μ lの純水に溶解し、重亜硫酸ナトリウム処理DNA検体とした。

(4)PCRプライマーの設計と合成

ヒトの表皮増殖因子様受容体2 (erbB2/HER2/neu) 遺伝子 (以下erbB2遺伝子と呼ぶ)のプロモーター周辺領域に豊富に存在するCpG配列のシトシン残基のメチル化を解析した。erbB2遺伝子のプロモーター周辺領域とは、erbB2遺伝子の翻訳開始点上流-1から-647番目までの塩基配列の周辺のことであり、具体的には配列番号8で示

される領域である[Mol. Cell. Biol., 7, 2597-2601 (1987), Gene 136, 361-364 (1993)]。これはGenBankデータベースのアクセション番号Z13970の配列における塩基番号3001から3647までの配列に相当する。この配列番号8の中でも、本実施例においては塩基番号87から塩基番号449までの配列に注目した。これは、翻訳開始点上流-199から-561番目までの配列に相当する。そこで、この部分のシトシン残基のメチル化を解析するためのPCRプライマーであるNeuS(配列番号5)およびNeuA(配列番号6)を、以下のようにして設計した。

まずこの領域(配列番号8の87~449番目の配列)のシトシン残基(C)をチミン残基(T)に替えた配列を想定し、配列番号7に示した。なぜならば、実施例2(3)の重亜硫酸ナトリウム処理により非メチル化シトシン残基はウラシル残基となり、PCR増幅後の塩基配列はチミン残基となると想定されるからである。

NeuSプライマー(配列番号5)は、配列番号7のうち塩基番号1から25までの配列に対応するセンスプライマーである。また、NeuAプライマー(配列番号6)は、配列番号7のうち塩基番号339から363までの配列に対応するアンチセンスプライマーである。これらのプライマー・オリゴヌクレオチドの化学合成は、ホスファアミダイト法[S.L.Beaucage & M.H.Caruthers, Tetrahedron Letters, 22, 1859 (1981)]を用いた。

(5)PCRによる増幅

実施例2(3)で得られたそれぞれの重亜硫酸ナトリウム処理DNA検体(患者由来9種類、健常者由来3種類)を鋳型DNAとし、NeuSプライマーおよびNeuAプライマーを用いて以下のようなPCRをそれぞれ行なった。

それぞれの鋳型DNA1 μ lに対し、純水35.5 μ l、塩化マグネシウム入り10 \times PCR緩衝液(GIBCO BRL社製)5 μ l、10mM dNTPミックス(GIBCO BRL社製)1 μ l、ジメチルスルホキシド(DMSO; Sigma社製)2.5 μ l、をそれぞれ加えた。さらに、NeuSプライマーおよびNeuAプライマーをそれぞれ20 μ Mとなるように純水に溶かしたものを、それぞれ2.5 μ lずつ加え、混合した。該混合物(50 μ l)を95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した後、1単位のTaq DNAポリメラーゼ(GIBCO BRL社製)を加えた。PerkinElmer社のサーマル・サイクラー(Thermal Cycler TM)を用いて、[94 $^{\circ}$ Cで30秒間、53 $^{\circ}$ Cで30秒間、72 $^{\circ}$ Cで1分間]のプログラムで40サイクルのPCRを行なった。

(6)PCR産物の精製

実施例2(5)で得たそれぞれのPCR産物(患者由来9種類、健常者由来3種類)をモレキュラー・クローニング 第2版に記載されている方法に従って、低融点アガロースゲル電気泳動で分画した。該低融点アガロースゲルを臭化エチジウムで染色した後、紫外線照射下で363bp(塩基対)のバンド部分の低融点アガロースゲルを切出し、Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega社製)を用い、添付マニュアルに従ってDNAを精製し、TE緩衝液(10mMトリス塩酸塩、1mM EDTA、pH8.0) 50 μ lで精製DNAを溶出し、精製PCR産物とした。

(7)PCR産物のクローニングと塩基配列決定

実施例2(6)で得た精製PCR産物(患者由来9種類、健常者由来3種類)各10 μ lについて、市販のTAクローニング・キットpGEM-T Easy Vector System II(Promega社製)を用い、添付のプロトコル(Promega社プロトコルTM042)に従いクローニングを行なった。最終的にトランスフォームした大腸菌JM109株(同キットに添付)を、50 μ g/mlのアンピシリン(Sigma社製)、40 μ g/mlのイソプロピルチオ- β -D-ガラクトシド(Sigma社製)および40 μ g/mlのX-gal(Sigma社製)を含む LB平板寒天培地(モレキュラー・クローニング 第2版)上で37℃で1日間培養した。平板寒天培地上に生じた白色のコロニーを、それぞれ20個ずつ任意に選び、それぞれからプラスミドDNAをモレキュラー・クローニング 第2版に従って調製した。

それぞれのプラスミドDNAを鋳型とし、プライマーにはユニバーサル・プライマーを用い、Perkin Elmer社のダイ・ターミネーター・サイクル・シーケンシング・キット(Dye Terminator Cycle Sequencing Kit)とPerkinElmer社のサーマル・サイクラー(Thermal CyclerTM)とを用いて、蛍光標識したヌクレオチドを取込ませる配列決定反応を行なった。反応操作の詳細はキットのマニュアルに従った。それぞれの反応試料について、自動塩基配列解読装置PRISMTM 310 Genetic Analyzer(PE Applied Biotechnologies社)を用いて、装置に添付されたマニュアルに従って塩基配列を解読した。

この解読結果から、各被験者から採取したゲノムDNA検体におけるシトシン残基のメチル化パターンを特定することができた。すなわち元来ゲノムにおいてメチル化されているシトシンは自動塩基配列解読装置においてシトシンとして読まれるのに対し、メチル化されていないシトシンはチミンとして読まれる。

(8)シトシン残基のメチル化状態

実施例2(7)の結果から得られた、各被験者のゲノムDNAのerbB2遺伝子のプロモーター領域のシトシンのメチル化パターンのうち、翻訳開始点上流-380、-372および-360番目(配列番号8における塩基番号268、276および288に相当)のシトシン残基のメチル化状態を図2に示した。C1からC3までは健常者の被験者3名を、R1からR9までは慢性関節リウマチ患者の被験者9名を、それぞれ表わす。配列を解析した各20クローンの配列のうち最も高頻度で出現したメチル化パターンを代表として示してある。すなわちそのシトシン残基がメチル化されていた場合には黒丸(●)が記してある。メチル化されていなかった場合には空白としてある。

(9)慢性関節リウマチの診断法(その1)

erbB2遺伝子の転写開始点から-380、-372および-360番目のシトシン残基のうち、メチル化されたシトシン残基の総数に対して、健常者と患者とでのそれぞれの度数分布を見た。下記に表を示す。

第 2 表

メチル残基の数	0	1	2
健常者	0	1	2
患者	6	3	0

メチル化された残基数の合計が1以下である場合、慢性関節リウマチであると診断できる。その際、健常者を患者と誤診してしまう確率は33%程度(1/3)である。

(10)慢性関節リウマチの診断法(その2)

塩基番号268のシトシン残基に注目する。この残基は健常者では3名全員がメチル化されているが、患者では9名中3名でのみメチル化されている。よって、塩基番号268のシトシン残基がメチル化されていない場合、慢性関節リウマチの可能性が67%程度(6/9)と診断できる。

産業上の利用可能性

被験者の血液等からゲノムDNAを抽出し、細胞増殖因子受容体遺伝子のシトシン残基のメチル化の程度を調べることによる、細胞増殖性疾患の診断法を提供する。

請求の範囲

1. サイトカイン受容体遺伝子の発現に関与する染色体DNAにおける、特定領域のシトシン残基のメチル化の程度を測定することを特徴とする、細胞増殖性疾患の診断法。
2. サイトカイン受容体遺伝子が、チロシンキナーゼ型受容体ファミリー、セリノートレオニンキナーゼ型受容体ファミリー、インターロイキン受容体ファミリー、インターフェロン受容体ファミリー、免疫グロブリン受容体ファミリー、細胞死受容体ファミリー、7回膜貫通型受容体ファミリーから選ばれる受容体の遺伝子である、請求の範囲1記載の診断法。
3. チロシンキナーゼ型受容体ファミリーの遺伝子が、表皮増殖因子受容体、表皮増殖因子様受容体2 (erbB2/HER2/neu)、血小板由来増殖因子受容体、血管内皮細胞増殖因子受容体から選ばれる受容体の遺伝子である、請求の範囲2記載の診断法。
4. 細胞増殖性疾患が、乾癬、慢性関節リウマチ、動脈硬化、再狭窄、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および固形腫瘍から選ばれる細胞増殖性疾患である、請求の範囲1記載の診断法。
5. 特定領域がプロモーターまたはイントロンのCpGアイランド中にある領域である請求の範囲1記載の診断法。
6. 特定領域が表皮増殖因子受容体遺伝子の発現に関与する領域であつて、配列番号4記載の塩基配列のうち、塩基番号381～962の塩基配列で示される領域である、請求の範囲1記載の診断法。
7. 配列番号4における塩基番号668、671、687および697のシトシン残基のメチル化の程度を測定することを特徴とする、請求の範囲6記載の診断法。
8. 配列番号4における塩基番号668のシトシン残基のメチル化の程度を調べることを特徴とする、請求の範囲7記載の診断法。
9. 請求の範囲1～8記載の診断法のいずれかに用いる、配列番号1または2記載の塩基配列を有するDNAプライマー。
10. 特定領域が、表皮増殖因子様受容体2 (erbB2/HER2/neu) 遺伝子の発現に

関与する領域であって、配列番号8記載の塩基配列で示される領域である、請求の範囲1記載の診断法。

11. 配列番号8における塩基番号268、276および288のシトシン残基のメチル化の程度を測定することを特徴とする、請求の範囲10記載の診断法。

12. 配列番号8における、塩基番号268のシトシン残基のメチル化の程度を調べることを特徴とする、請求の範囲11記載の診断法。

13. 請求の範囲1～4および10～12記載の診断法のいずれかに用いる、配列番号5または6記載の塩基配列を有するDNAプライマー。

14. 配列番号1、2、5または6で示される塩基配列を有するDNA。

15. サイトカイン受容体遺伝子の発現に関与するDNAにおいて特定領域のシトシン残基のメチル化の程度を検出する方法。

16. メチル化の程度を検出する方法が、メチル化感受性制限酵素を用いる方法、ヒドラジン、過マンガン酸または重亜硫酸ナトリウムによる化学修飾を用いる方法、メチル化DNAに特異的な抗体を用いる免疫学的方法、アフィニティ・カラム法もしくはDGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)法である請求の範囲15記載の方法。

第 1 図

	健康者			
	-446	-443	-427	-417
N1	●	●	●	●
N2	●		●	●
N3	●	●	●	●
N4	●	●	●	●
N5	●	●	●	●
N6	●	●		●
N7	●	●	●	
N8	●	●		●
N9		●	●	●
N10	●	●	●	●
N11	●	●		
N12	●	●		
N13		●	●	●
N14	●	●	●	●
N15		●		●
N16	●	●	●	●
N17	●	●	●	●
N18		●	●	●
N19		●	●	●
N20	●	●	●	
N21	●	●	●	●
N22		●	●	●
N23		●	●	●
N24		●	●	●
N25	●	●	●	
N26	●	●		●
N27		●	●	●
N28	●	●	●	●
N29	●	●		●
N30				

	乾癬患者			
	-446	-443	-427	-417
P1		●		
P2				
P3		●	●	
P4				
P5				
P6				
P7		●		
P8		●	●	●
P9				
P10	●	●		
P11	●			
P12				
P13		●	●	●
P14				
P15				
P16				
P17	●		●	●
P18				●
P19				
P20		●	●	●
P21				
P22				
P23	●	●		
P24		●		
P25				
P26	●		●	●
P27				
P28		●		
P29				●
P30				

第 2 図

健康人

	-380	-372	-360
C1	●		●
C2	●		
C3	●	●	

慢性関節リウマチ患者

	-380	-372	-360
R1	●		
R2			
R3			
R4	●		
R5			
R6			
R7			
R8			
R9	●		

SEQUENCE LISTING

<110> Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd

<120> Diagnostic method for detecting cell-proliferating diseases

<130> 11155

<140>

<141>

<150> H10-265089

<151> 1998-09-18

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 1

ccaaaacgaa ttcaaaactc caaccacctc

30

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 2

taggggaagc ttggggattt gaataaagga gt

32

<210> 3

<211> 582

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

tagggggagg ttggggattt gaataaagga gtagttttt tgttggtgtt attatttgat	60
gttggtttta aggtttggtt agtttgttta aagttggtat aagtttggtt tgtaaaataa	120
aagaagggaag aggggggaagg ggattttggt atagatttgg ttgatttgg atatagggtg	180
ggttgtaagt ttgtggggat tgggtttaga ggggtagtgt tgggaatgtt ttttttgga	240
attaattttt tagggtattg tttttttttt atgtgttgtt ttatttttgt tggagattag	300
gttttgtggg ggttattgtg tttattgttt tgtggttgtt ggttttgggt ttttgttgtt	360
ggtttttttt tttttttttt gtattttttt ttttttttgt tttttttgat ttttttttg	420
ttgtttggtt tttttttttt ttgttttgtt ttttgtgtt tggtttgtgt gagttagatg	480
tttgggtagt ttttgggtga gtgtggttgt agtagttttt tttttttgta tgggtgtgagt	540
gtttgttgtg ttgagggtgt tggagttttg agttagtttt gt	582

<210> 4

<211> 1200

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

aagcttccgc gagtttccca ggcatttctc ctgcggggac taccaggggt agtgggacac	60
ttagcctctc taaaagcacc tccacggctg tttgtgtcaa gcctttattc caagagcttc	120
acttttgca agtaatgtgc ttcacacatt ggttcaaag taccatggc tggttgcaat	180
aaacattaag gaggcctgct ictgcacccg gagttggtgc cctcatttca gatgatttcg	240
agggtgcttg acaagatctg aaggaccctc ggactttaga gcaccacctc ggaacgcctg	300
gcaccctctc cgcgcgggca cggcgacctc ctgagctgcc aggccagcct ctgatccccg	360
cgagggtgcc cgtagtctg cagggggagg ctggggaccc gaataaagga gcagtttccc	420
cgtcgggtgcc attatccgac gctggctcta aggtcggcc agtctgtcta aagctggtac	480
aagtttgctt tgtaaaacaa aagaagggaag aggggggaagg ggaccctggc acagatttgg	540
ctgcacctgg acataggctg ggctgcaagt ccgcggggac cgggtccaga ggggcagtgc	600

tggaacgcc cctctcggaa attaacctct cagggcaccg ctccctccc atgcgcgcc	660
ccactccgc cggagactag gtcccgcggg ggccaccgtg tccaccgct cgcgccgct	720
ggccttgggt ccccgctgt ggttctctc cctctctc gcattctct cctcctctgc	780
tcctccgat ccctctccg ccgctggtc cctctctc ccgccctgcc tcccgcgct	840
cggcccgcg gagctagacg tccgggcagc ccccgcgca gcggcgccg agcagctcc	900
tcccccgca cgggtgtgag gcccgccgc cggaggcggc cggagtccg agctagccc	960
cgggccgcg ccgccagac cggacgacg gccacctgt cgcgtccgc cgagtcccc	1020
cctcgccgc aacgccacaa ccaccgca cggcccccgt actcgtcca gtattgatc	1080
ggagagccg agcgagctt tcggggagc gcgatgcac cctccggac ggccgggca	1140
gcgtcctgg cgctgtggt tgcgtctgc ccggcgagtc gggctctga ggaaaagaa	1200

< 2 1 0 > 5

< 2 1 1 > 2 5

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

< 4 0 0 > 5

ggtttggat ggagtaggat gtaag

25

< 2 1 0 > 6

< 2 1 1 > 2 5

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

< 4 0 0 > 6

cttatacttc ctcaaacac cctcc

25

< 2 1 0 > 7

< 2 1 1 > 3 6 3

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Human

<400>7

ggtttgggat ggagtaggat gtaagtttt taggaagta gataattgag atttaaaggg	60
tgtaagagt gtagtttag ggaatttat ttggatttt ggggagggg gtagagttat	120
tagttttgt atttaggat ttttgagga aaagtgtgag aatggttga gtaatttag	180
gtgttttgg gtaggaggg atgatttagg ttgtgtgaa gagaggaga aaggaagtt	240
ggagttgtt gatttttaga tttgttgga atgtagtgg aggggtgag ttggagtgt	300
gtttgtttt aattattgga gaaggaggag gtggaggagg aggttgtt gaggaaglat	360
aag	363

<210>8

<211>647

<212>DNA

<213>Human

<400>8

aggtaaacac aacacatccc cctccttgac tatcaatttt actagaggat gtggtgggaa	60
aaccattatt tgatattaaa acaataggct tggatggag taggatgcaa gctcccagg	120
aagtagata actgagactt aaagggtgtt aagagtggca gcctaggga atttatcccg	180
gactccgggg gagggggcag agtcaccagc ctctgcattt agggattctc cgaggaaaag	240
tgtgagaacg gctgcaggca acccagcgt cccggcgcta ggaggacga cccaggcctg	300
cgcaagaga gggagaaagt gaagctggga gttgccgact cccagacttc gttggaatgc	360
agttggaggg ggcgagctgg gagcgcgctt gctcccaatc accggagaag gaggaggtgg	420
aggaggaggg ctgcttgagg aagtataaga atgaagtgt gaagctgaga ttcccctcca	480
ttgggaccgg agaaaccagg ggagccccc gggcagccgc gcgccccttc ccacggggcc	540
ctttactgcg ccgcgcgcc ggcgccacc cctcgcagca cccgcgcgcc cgcgcctcc	600
cagccgggtc cagccggagc catggggccg gagccgcagt gagcacc	647